

Nanoselluloosan mahdollisuudet luun kudosteknologiassa

Venla Korpela
Luonnontieteiden kandidaatin tutkielma
Turun Yliopisto
Biolääketieteen koulutusohjelma
Lääketieteellinen tiedekunta
Biolääketieteen laitos

06.05.2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Kandidaatin tutkielma

Oppiaine: Biolääketiede

Tekijä: Venla Korpela

Otsikko: Nanoselluloosan mahdollisuudet luun kudosteknologiassa

Ohjaaja: Terhi Heino, yliopistonlehtori, dosentti

Sivumäärä: 25 sivua

Päivämäärä: 06.05.2024

Luun vauriot voivat aiheutua tapaturmista, ikääntymisestä, sairauksista tai kasvaimista. Luu kykenee kuitenkin parantumaan itsestään ja vaurioituneen kudoksen tilalle pystytään luomaan uutta luukudosta ajan kanssa. Luun parantuminen itsestään rajoittuu kuitenkin pienempiin vaurioihin, joten isommat, ns. kriittisen koon ylittävät luuvauriot ja luupuutokset vaativat kliinistä hoitoa. Luusiirteet ja keinotekoiset implantit ovat yleisimpiä isompien luuvaurioiden hoitomuotoja. Vaikka nämä perinteiset hoitomenetelmät ovat olleet käytössä jo pitkään, uudet biomateriaalit, kuten nanoselluloosa tarjoavat lupaavia mahdollisuuksia parantaa hoitomuotoja entisestään. Biomateriaalit ovatkin olennainen osa nykyaikaista luun kudosteknologiaa, ja ne tarjoavat uudenlaisia ratkaisuja luuvaurioiden hoitoon.

Nanoselluloosa on nanomittakaavan materiaalia, jota eristetään selluloosasta. Sitä voidaan valmistaa esimerkiksi puupohjaisesta sellusta, puuvillasta tai sokeriruo'osta. Myös tietyt bakteerit kykenevät valmistamaan luonnostaan selluloosaa. Nanoselluloosa voidaan luokitella sen muodon ja valmistustavan perusteella. Kolme nanoselluloosan päämuotoa ovat nanoselluloosakuitu (engl. cellulose nanofibril, CNF), nanoselluloosakide (engl. cellulose nanocrystal, CNC), ja bakteeriperäinen nanoselluloosa (engl. bacterial nanocellulose, BNC). Nanoselluloosan valmistus perustuu sen mekaaniseen erottamiseen selluloosan muista komponenteista, kuten ligniinistä, hemiselluloosasta ja raakamateriaalin muista epäpuhtauksista. Lisäksi raakamateriaalia käsitellään kemiallisesti, jotta nanoselluloosaa saadaan muodostettua.

Selluloosalla ja luukudoksella on samankaltaisia rakenteellisia ja mekaanisia ominaisuuksia. Selluloosa on helposti muokattava materiaali, joten sen ominaisuuksia voidaan muuttaa muokattavaan esimerkiksi luusolujen tarpeita. Nanoselluloosan osoitettu olevan materiaalina osteokonduktiivinen eli se tarjoaa sopivan kasvualustan luusoluille kiinnittyä ja jakaantua. Lisäksi nanoselluloosa toimii osteoinduktiivisesti eli se edistää luun mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista osteoblasteiksi, ja siten nopeuttaa luun paranemista. Nanoselluloosa ei ole toksinen elimistölle, eikä se aiheuta helposti hylkimisreaktioita. Nämä ominaisuudet tekevätkin nanoselluloosasta bioyhteensopivan luun kanssa.

Luukudoksen lisäksi nanoselluloosaa on pyritty hyödyntämään muussakin kudosteknologiassa, ja esimerkiksi haavan hoidossa nanoselluloosa on jo kliinisessä käytössä. Nanoselluloosa onkin lupaava tulevaisuuden biomateriaali, joka tarjoaa uusia mahdollisuuksia uusiin kudosteknologisiin hoitomuotoihin.

Asiasanat: Luun kudosteknologia, nanoselluloosa, osteokonduktiivisuus, osteoinduktiivisuus, regeneratiivinen lääketiede

Lyhenneluettelo

3D-tulostus	Kolmiulotteinen tulostus
ALP	Alkalinen fosfataasi
ARS	Alizarin Red S-värjäys
BNC	Bakteeriperäinen nanoselluloosa
CNC	Nanoselluloosakide
CNF	Nanoselluloosakuitu
COL-I	Tyypin I kollageeni
DAC	2,3-dialdehydi selluloosa
hMSC	Ihmisen mesenkymaalinen kantasolu
M2-makrofagi	Tulehdusta hillitsevä polarisoitunut makrofagi
MC3T3-E1	Hiiren osteoblastin esiastesolu
OCN	Osteokalsiini
PLA	Polylaktidi
PVA	Polyvinyylialkoholi
Runx2	Runt-perheen transkriptiotekijä 2
SBF	Simuloitu kehonneste
TEMPO	(2,2,6,6-tetrametyyli-piperidin-1-yyli) oksyyli
UDP	Uridiinidifosfaatti

Sisällysluettelo

Lyhenneluettelo	3
1 Johdanto	5
2 Nanoselluloosa	6
2.1 Nanoselluloosan kemiallinen rakenne	6
2.2 Nanoselluloosan synteesi ja tuotto	7
3 Nanoselluloosan jatkokäsittely käyttökohteisiin	10
3.1 Nanoselluloosan käyttömuodot	10
3.2 Nanoselluloosan ominaisuuksien tehostaminen lisäaineilla	11
4 Nanoselluloosan bioyhteensopivuus luukudoksen kanssa	13
4.1 Solujen jakaantuminen	13
4.2 Solujen erilaistuminen	15
4.3 Immunologiset vasteet	16
4.4 Nanoselluloosan hajoaminen	18
4.5 Nanoselluloosan haittavaikutukset	18
5 Tulevaisuuden näkymät	20
6 Johtopäätökset	21
Lähteet	22

1 Johdanto

Luun vauriot aiheuttavat huomattavia haasteita terveydenhuollossa. Luun vauriot voivat aiheutua tapaturmista, ikääntymisestä, sairauksista ja kasvaimista.[1] Luun vaurioiden kasvava määrä johtuu etenkin osteoporoosin aiheuttamista murtumista. Koska väestö ikääntyy, myös ikääntyvillä ihmisillä esiintyvät taudit, kuten osteoporoosi yleistyvät. Maailmassa 158 miljoonaa ihmistä kuului osteoporoottisten murtumien riskiryhmään vuonna 2010, ja määrän ajatellaan kaksinkertaistuvan länsimaissa vuoteen 2040 mennessä.[2]

Luun nykyisiin hoitomenetelmiin kuuluvat autologiset ja allogeeniset luusiirteet, joissa luusiirre on joko potilaalta itseltään, tai siirre on elinluovuttajalta. Luovutettujen siirteiden vähäisyys, tulehduksen riski ja hylkimisreaktiot ovat haasteita aiheuttavia luusiirteiden käytössä. Näiden ongelmien vuoksi onkin kehitetty keinotekoisia materiaaleja luuvaurioiden korjaamiseksi. Luun kudosteknologiassa kasvavaa kiinnostusta herättävät biomateriaalien mahdollisuudet implanttimateriaalina.[1,3] Nanoselluloosa on uusi kudosteknologian biomateriaali, joka tarjoaa mahdollisesti ratkaisuja luun hoitomenetelmien haasteisiin.

Tässä tutkielmassa luodaan yleiskuva nanoselluloosan mahdollisuuksista luun kudosteknologiassa. Tarkoituksena on tehdä kirjallisuuskatsaus nanoselluloosan ominaisuuksiin ja sen yhteensopivuuteen luukudoksen kanssa. Tutkielmassa selvitetään, miten nanoselluloosa soveltuu luun kudosteknologiseksi materiaaliksi nykyisten hoitomateriaalien ja -menetelmien rinnalle.

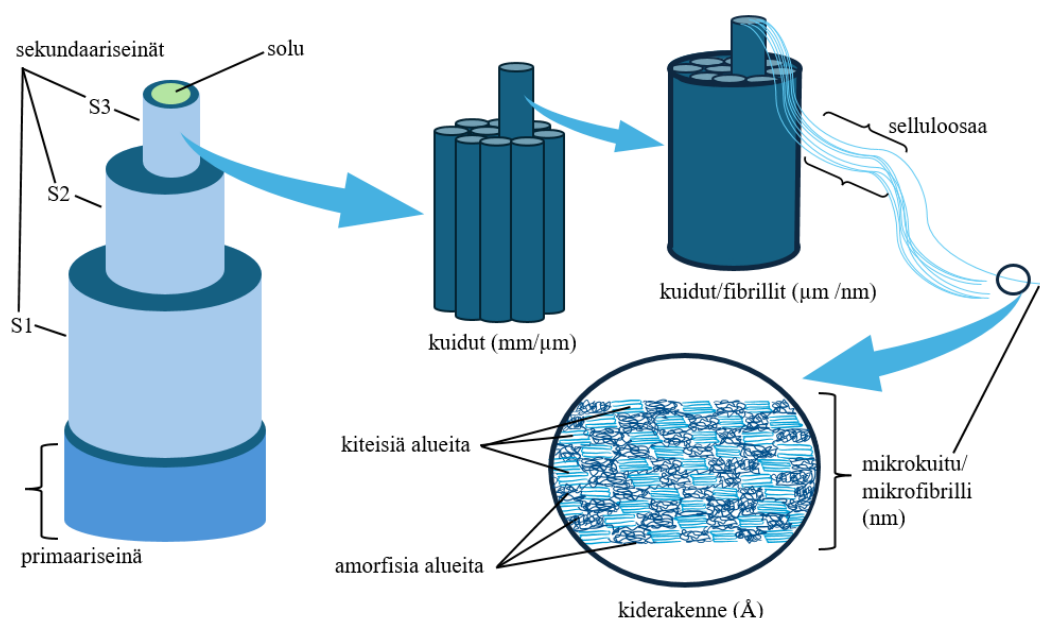
Tutkielmassa tarkastellaan nanoselluloosan rakennetta, eri päämuotoja sekä tuotantomenetelmiä. Nanoselluloosan rakenteesta edetään tutkielmassa nanoselluloosan jatkosovelluksiin eri käyttömuodoissa, ja käydään läpi yleisimpiä lisäaineita, joilla nanoselluloosan ominaisuuksia tehostetaan. Eri nanoselluloosan päämuotojen bioyhteensopivuutta ja vuorovaikutusta luusolujen kanssa vertaillaan luvussa 4. Tutkielman tarkoituksena on myös selvittää mahdollista elimistön immunologisen vasteen muodostumista nanoselluloosalle, ja pohtia muita mahdollisia aiheutuvia haittoja. Lopuksi tutkielmassa tehdään katsaus nanoselluloosan tulevaisuuden kehityskohteille luun kudosteknologisena materiaalina.

2 Nanoselluloosa

Nanoselluloosa on selluloosasta jatkokäsitelty materiaali, jonka rakenneosat ovat nanoskaalassa (nanometrejä) [4]. Nanoselluloosalla on monia erilaisia morfologisia muotoja, riippuen siitä, mistä selluloosan lähteestä se on eristetty, ja miten se käsitellään [4,5]. Tässä tutkielmassa tehdään katsaus kolmeen nanoselluloosan eri muotoon, nanoselluloosakuituun (engl. CNF, cellulose nanofibrils), nanoselluloosakiteisiin (engl. CNC, cellulose nanocrystal) ja bakteeriperäiseen nanoselluloosaan (engl. BNC, bacterial nanocellulose).

2.1 Nanoselluloosan kemiallinen rakenne

Kasvien soluseinät muodostuvat useista kerroksista: primaariseinästä ja sekundaariseinistä (kuva 1). Nämä rakentuvat edelleen pienemmistä kuiduista, jotka ovat milli-, mikro- ja nanometrien mittakaavassa (kuva 1). Selluloosa on yksi soluseinän komponenteista, ja se on rakenteeltaan puolikiteinen eli se koostuu kiteisistä ja amorfisista alueista, kuten kuvassa 1 on esitetty. Kiteisten alueiden järjestyneisyys ja vetysidokset tuovat selluloosan rakenteeseen vahvuutta. Amorfiset alueet kiteisten alueiden lomassa lisäävät selluloosan rakenteeseen joustavuutta.[5]



Kuva 1. Kasvisoluseinän rakenne. Kasvisolulla on yksi primaariseinä, sekä kolme sekundaariseinää S1, S2 ja S3. Kasvisoluseinän rakenne on kuitumaista, ja sen yksi rakenneosista on selluloosa. Selluloosan kiderakenteessa on kiteisiä ja amorfisia alueita. Kuva on tehty perustuen Hanieh ym. (2017) julkaisuun [5].

Selluloosa on polysakkaridi. Selluloosan kemiallinen rakenne koostuu β -D-glukoosiyksiköistä, jotka muodostavat glykosididoksin polymeerejä.[4,5] Selluloosassa β -D-glukoosiyksiköt ovat ketjussa 180° kulmassa toisiinsa nähden, jolloin muodostuneet polymeerit ovat lineaarisia [4]. Selluloosamolekyyleissä vuorovaikutuksia ovat kovalenttiset glykosididokset β -D-glukoosiyksiköiden välillä, β -D-glukoosiyksiköiden väliset vetysidokset, sekä molekyylien väliset vetysidokset. Selluloosan polymeeriketjut järjestäytyvät näiden molekyylien välisten vetysidosten vuoksi kimppuihin, joista edelleen muodostuu suurempia säierakenteita.[4,5]

2.2 Nanoselluloosan synteesi ja tuotto

Nanoselluloosan tuottoprosessi vaihtelee lähtöaineen ja halutun lopputuotteen rakenteellisten ominaisuuksien mukaan. Nanoselluloosan tuottamiseksi käytetään mekaanisia, kemiallisia ja entsyymaattisia menetelmiä. Lisäksi voidaan hyödyntää bakteereja erillisenä menetelmänä tuottaa BNC:tä.[4] Taulukossa 1 on eritelty eri nanoselluloosan muotoja, ja niiden tuotantomenetelmiä.

CNF koostuu taipuisista kuiduista, jotka ovat muutamia mikrometrejä pitkiä ja halkaisijaltaan nanomittakaavassa [4,6]. CNF koostuu selluloosan tavoin kiteisistä ja amorfisista alueista [5]. CNF:n lähtöaineena käytetään yleensä puuta ja sellumassaa [7–9], mutta myös esimerkiksi sokeriruokoa [6,10] tai puuvillaa [4]. Tyypillisesti raakamateriaali esikäsitellään valkaisemalla [6,7,9,10].

CNF:ää valmistetaan mekaanisin ja kemiallisin menetelmin [4,6,7,9,10]. Kemiallisesti CNF:n valmistuksessa hapetetaan raakamateriaali esimerkiksi käyttäen TEMPO:a eli (2,2,6,6-tetrametyyli-piperidin-1-yyli)oksyylia [4,6,7,9,11–18]. Hapetuksen jälkeen materiaali puhdistetaan tislattulla vedellä [6,7,9,10]. Mekaanisesti raakamateriaalia voidaan käsitellä kemiallisen käsittelyn jälkeen esimerkiksi homogenisoimalla [4,7,9,10], suodattamalla [6,7,9], jauhamalla [4,6] tai sonikoimalla [4].

CNC:n eristäminen kasvisolun seinämän selluloosasta perustuu sen rakenteen amorfisten alueiden hajottamiseen. Tällöin saadaan eristettyä kiteiset alueet selluloosan rakenteesta, mikä muodostaa sauvamaisia rakenteita eli CNC:tä. Koska CNC:n molekyylirakenne on järjestäy-

tynyt tiiviisti kiteiseksi, on CNC:n rakenneosaset vähemmän joustavia verrattuna CNF:ään.[4,5] CNC:n lähtöaineena käytetään CNF:n tavoin puuta ja sellumassaa [1,4] sekä sokeriruokoa [19], mutta myös esimerkiksi riisileseitä [20] tai pistaasipähkinän kuoria voidaan käyttää [21]. Kuten CNF:n, myös CNC:n raakamateriaalia voidaan esikäsitellä valkaisuamalla [19].

CNC:n valmistuksessa raakamateriaalin kiteisten alueiden erottaminen amorfisista alueista tehdään hydrolyysillä käyttäen väkeviä happoja kuten esimerkiksi yleisesti käytettyä rikkihappoa [1,3,19]. Rikkihappoa käytetään CNC:n hydrolysoinnissa erityisesti, sillä se reagoi selluloosan pinnalla olevien hydroksiryhmien kanssa muodostaen sulfoniryhmiä. Sulfoniryhmät tekevät pinnasta negatiivisesti varautuneen, joka puolestaan auttaa estämään CNC:n kiteiden kasaantumista (engl. aggregation).[5] Kemiallisen happokäsittelyn jälkeen raakamateriaalia pestään ionipuhdistetulla [1] tai tislattulla vedellä [19–21], ja voidaan sentrifugoida epäpuhtauksien sekä ylimääräisen hapon poistamiseksi [1,4,20,21]. Lisäksi raakamateriaalia voidaan käsitellä mekaanisesti esimerkiksi suodattamalla [19–21] tai sonikoimalla [1,21].

Bakteerisoluiissa selluloosan polymeerien syntetisointi saa alkunsa glukoosi-6-fosfaasista. Glukoosi-6-fosfaasi muutetaan uridiinidifosfaatti-glukoosiksi eli UDP-glukoosiksi. Ensin fosfoglukomutaasi isomerisoi glukoosi-6-fosfaasin glukoosi-1-fosfaasiksi, joka edelleen muutetaan UDP-glukoosiksi UDP-glukoosi-pyrofosforylaasin katalysoimana. UDP-glukoosia käytetään edelleen β -1,4-glukaanin polymerisaatioon, jonka katalysoijana toimii selluloosa-syntaasi.[4,22]

Gluconoacetobacter xylinus -lajin bakteeri, joka tunnetaan myös *Komagataeibacter xylinus* -nimellä, tuottaa selluloosaa nauhamaisesti. Nauha koostuu mikrokuiduista. Mikrokituja muodostuu komplekseissa (engl. TC, terminal complex), jotka koostuvat kolmesta alayksiköstä, joista jokainen alayksikkö koostuu vielä vähintään 16 katalyyttisestä alayksiköstä. Nämä 16 katalyyttistä alayksikköä tuottavat jokainen yhtä β -1,4-glukaani polymeeriketjua. Katalyyttisissä alayksiköissä muodostuneet 1,4-glukaani polymeeriketjut muodostavat kiteen (engl. minicrystallines), joista edelleen yhdistyy yksi mikrokiturakenne. Kymmenistä tai sadoista mikrokuiduista lopulta muodostuu selluloosauhu.[22]

BNC:n tuottamisessa bakteerit kasvavat elatusaineessa, jossa ne muodostavat nanoselluloosakalvoa nesteen pintaan. Monessa tutkimuksessa on käytetty Hestrin-Schramm -elatusainetta,

joka sisältää glukoosia, peptonia, hiivauutetta, natriumvetyfosfaattia ja sitruunahappoa.[15,23–27] Joissakin tutkimuksissa on käytetty lisäksi parafiinipartikkeleita (engl. paraffin particles/microspheres) luomaan kolmiulotteista tukirakennetta nanoselluloosalle [15,25,27]. Aiemmin mainitun *Gluconacetobacter xylinus* -lajin lisäksi [24,28] tutkimuksissa on käytetty myös muita *Komagataeibacter* -suvun bakteerilajeja kuten esimerkiksi *Komagataeibacter medellinensis* -lajia [15,25,27] tai *Komagataeibacter hansenii* -lajia [26]. Selluloosakalvoa voidaan puhdistaa natriumhydroksidilla (60-80°C) [23,24,26–28] tai vaihtoehtoisesti kaliumhydroksidilla [15,25,27]. Tämän jälkeen nanoselluloosaa huuhdellaan ionipuhdistetulla [15,23,24,27] tai tislattulla vedellä sen neutraloimiseksi [25,26,28]. Nanoselluloosaa vielä edelleen voidaan puhdistaa steriloimalla [23,26]. Lisäksi, jos on käytetty parafiinipartikkeleita, nanoselluloosaa jatko-puhdistetaan etanolilla (75°C), jonka jälkeen parafiininanoselluloosatukirakenteet pestään vielä ksyleenillä parafiinipartikkeleiden irrottamiseksi [15,25,27].

Taulukko 1. Nanoselluloosan eri muodot ja niiden tuotantomenetelmät.

	CNF	CNC	BNC
Lähtöaine	Puu, sellumassa [7–9], sokeriruoko [6, 10], puuvilla [4]	puu, sellumassa [1,4], sokeriruoko [19], riisilese [20], pistaasipähkinä [21]	<i>Komagataeibacter</i> -suvun bakteerilajit (<i>medellinensis</i> [15,25,27], <i>xylinus</i> [22,24,28], <i>hansenii</i> [26])
Tuotantomenetelmä	Kemiallinen; hapetus (TEMPO) [4,6,7,9,11–18] Mekaaninen; homogenisointi [4,7,9,10], suodatus [6,7,9], jauhaminen [4,6], sonikointi [4]	Kemiallinen; hydrolyysi [1,3,19] [4,5] Mekaaninen; sentrifugointi [1,4,20,21], suodatus [19–21], sonikointi [1,21]	Parafiinipartikkelit [15,25,27], Natriumhydroksidi [23,24, 26–28] tai kaliumhydroksidi [15,25,27] puhdistus, sterilointi [23,26]

3 Nanoselluloosan jatkokäsittely käyttökohteisiin

Nanoselluloosaa voidaan käsitellä edelleen esimerkiksi sen käytön helpottamiseksi tai muokkaamalla sitä sopivammaksi tiettyyn käyttötarkoitukseen. Näitä muokkauksia voidaan tehdä joko eri menetelmin, tai lisäämällä muita aineita nanoselluloosan joukkoon. Nanoselluloosalle on useampia käyttömuotoja, ja tiettyjä tyypillisimpiä lisäaineita, joilla tavoitellaan parasta mahdollista materiaalityöstökäsitelyä luun kudosteknologiassa sovelluksiin.

3.1 Nanoselluloosan käyttömuodot

Nanoselluloosaa voidaan muokata erilaisiin muotoihin halutun käyttökohteen mukaisesti. Näitä muotoja ovat erilaiset geelit, kuten hydrogeeli ja aerogeeli, kalvot, levyt sekä esimerkiksi biomusteet. Erilaisia käyttömuotoja voidaan hyödyntää luun kudosteknologiassa eri tarkoituksiin, kuten esimerkiksi luun implanttimateriaaliksi [11,20,29,30] tai luulääkkeiden kuljetukseen [31]. Nanoselluloosaa on tutkittu luun kudosteknologiassa soluilla usein hydrogeelinä [1,6,7,9,31–33] ja aerogeelinä [34]. BNC:tä tutkitaan usein kalvoina [15,23,24,26,30] tai kolmiulotteisena tukirunkona, joita on valmistettu hyödyntäen parafiinipartikkeleita [25,27], kuten aiemmin luvussa 2.2 kuvailtiin. Nanoselluloosan tutkimuksissa luun implanttimateriaalina jyrksijöillä, implanttina on käytetty kuivatettua nanoselluloosahydrogeeliä [20,29]. Vaihtoehtoisesti yhdessä tutkimuksessa on käytetty hydrogeelistä valmistettua biomustetta, jossa BNC tulostettiin kolmiulotteisella tulostimella implantin muotoon [11].

Hydrogeeliä käytetään nanoselluloosan tutkimuksissa joko sellaisenaan, tai sitä voidaan kuivattaa pakastekuivaus-menetelmällä (engl. freeze drying) säilyvyyden tai komposiitiksi muokkaamisen vuoksi. Toisinaan pakastekuivatettua hydrogeeliä kutsutaan kryogeeliksi (engl. cryogel). Aerogeenin valmistuksessa käytetään lähtömateriaalina myös hydrogeeliä, mutta kuivaus tapahtuu hiilidioksidin avulla. Menetelmää kutsutaan superkriittiseksi kuivaukseksi (engl. supercritical drying), jossa geelin huokoinen rakenne säilyy pakastekuivausta paremmin, sillä pakastekuivauksessa muodostuneet jääkiteet voivat rikkoa huokoista rakennetta. Aerogeelillä on hydrogeeliin verrattuna pysyvämpi rakenne ja muoto ja sitä on helpompi säilyttää.[35] Toisaalta hydrogeeli saattaisi olla vähemmän invasiivinen vaihtoehto verrattuna aerogeeliin. Hydrogeelien injisoitavuudesta on tehty tutkimusta, ja nanoselluloosahydrogeeliä on saatu kulkemaan 23G kokoisen neulan läpi [32].

Biomusteita voidaan hyödyntää nanoselluloosaan perustuvan tukirungon 3D-tulostamisessa. Biomusteiden valmistukseen on eri tapoja. Biomusteessa voidaan käyttää mitä tahansa nanoselluloosan kolmesta muodosta (CNF, CNC, BNC) [11,36–38]. Yleisiä matrikseja, joihin nanoselluloosaa yhdistetään, ovat esimerkiksi gelatiini [11,36,37], pektiini [36] tai (natrium)alginaatti [37,38]. Biomuste voi koostua pelkästään nanoselluloosasta ja matriksista [11], tai siihen voidaan lisätä erinäisiä aineita esimerkiksi grafeenioksidia [36,38], hydroksiapatiittia [38] tai maleiinihappoa [11] tuomaan mekaanista lujuutta materiaaliin. Biomuste on koostumukseltaan hydrogeeliä [11,36–38].

Nanoselluloosaan perustuvia luuimplantteja voidaan käyttää myös edistämään luun uudismuodostusta hyödyntämällä niitä esimerkiksi bisfosfonaattien kuljetusmekanismina. Kuljetusmekanismeissa yhdistetään bisfosfonoitu nanoselluloosa β -trikalsiumfosfaattiin, jotka näin yhdessä muodostavat komposiitin. Komposiitissa bisfosfonaatit muodostavat β -trikalsiumfosfaatin kalsiumionien kanssa ionisidoksia pH:n ollessa noin 7. Osteoklastien happamassa mikroympäristössä nämä ionisidokset katkeavat ja komposiitti hajoaa. Kun komposiitti hajoaa, vapautuu bisfosfonoitu nanoselluloosa osteoklastien mikroympäristöön, jolloin bisfosfonaatti lääkeaineena pääsee vaikutuskohteeseensa. Eräissä tutkimuksissa havaittiin, että osteoklastien esiasteiden altistaminen kyseiselle komposiitille esti sekä osteoklastien että luun hajotuksesta kertovien resorptiokuoppien muodostumista. Komposiitti oli muodoltaan injisoitavaa, mikä mahdollistaisi uuden vähemmän invasiivisen hoitomuodon kehittämisen luuvaurioiden hoitoon.[31]

3.2 Nanoselluloosan ominaisuuksien tehostaminen lisäaineilla

Erilaisten aineiden lisäys nanoselluloosaan on olennaista materiaalin optimoimiseksi sen käyttötarkoitukseen luun kudosteknologiassa. Nanoselluloosan yhdistäminen lisäaineisiin voidaan tehdä erinäisistä syistä, joita ovat esimerkiksi luun kantasolujen kasvuympäristön optimointi, materiaalin mekaanisten ominaisuuksien tehostaminen tai materiaalin muokkaaminen käytävämpään muotoon.

Hydroksiapatiitti, kalsiumfosfaatti ja fosfaatti ovat yleisimpiä aineita, joiden avulla on tehostettu nanoselluloosatukirungon mineralisaatiota. Nanoselluloosan mineralisaatiolla saadaan aikaan luun kantasoluille tukirunko, joka matkii niiden luonnollista luun kasvuympäristöä.[6–

8,12,32,38] Nanoselluloosaa on myös kemiallisesti muokattu vaihtamalla sen pintarakenteen funktionaalisia ryhmiä TEMPO-hapetuksella [9], jotta voitaisiin tutkia nanoselluloosan pintarakenteen vuorovaikutuksia solujen kanssa. Näiden muokkauksien vaikutuksia solujen kiinnittymiseen, elinvoimaisuuteen, jakaantumiseen ja erilaistumiseen käsitellään tarkemmin luvussa 4.

Polyvinyylialkoholi (PVA) [19,21] ja polylaktidi (PLA) [20] ovat polymeerejä, joiden yhdistämistä nanoselluloosaan komposiittimateriaaleiksi ja niiden mekaanisia ominaisuuksia sekä bioyhteensopivuutta luukudoksen kanssa on tutkittu. Lisäksi esimerkiksi luun lääkeaineita voidaan yhdistää nanoselluloosan kanssa [31], kuten aiemmin jo luvussa 3.1 käsiteltiin. Tällöin nanoselluloosan tarkoituksena on edesauttaa luun uudismuodostusta, tosin hieman eri mekanismein kuin esimerkiksi implanttimateriaalin käyttötarkoituksessaan. Nanoselluloosaan voidaan yhdistää myös aineita muistakin syistä kuin tehostamaan sen bioyhteensopivuutta luukudoksen kanssa. Aiemmin tässä luvussa kerrottiin nanoselluloosan eri käyttömuodoista, ja käytettävyyden parantaminen onkin yksi syy nanoselluloosan yhdistämiselle muiden aineiden kanssa. Esimerkiksi 3D-tulostusta varten biomusteen valmistuksessa käytetään monesti gelatiinia [11,36,37], johon nanoselluloosaa yhdistetään.

4 Nanoselluloosan biohteensopivuus luukudoksen kanssa

Biohteensopiva tukirunko tarkoittaa tukirungon toimivan suotuisana solunulkoisena rakenteena soluille [24]. Sopiva tukirunkomateriaali (engl. scaffolding material) muistuttaa solujen luontaista mikroympäristöä [27]. Luun kudosteknologiassa sopiva tukirunkomateriaali on osteoinduktiivinen eli stimuloi luukudoksen muodostusta ja solujen erilaistumista. Lisäksi tukirunko on osteokonduktiivinen eli tarjoaa sopivan huokoisen soluväliaineen (engl. ECM, extracellular matrix), jotta solut voivat kiinnittyä ja jakaantua. Huokoinen tukirunko edistää myös verisuonittumista, ja siten solut saavat tarvitsemiansa ravinteita pysyäkseen elinvoimaisina ja jakaantuakseen [21].

4.1 Solujen jakaantuminen

CNF:ää on tutkittu ihmisestä peräisin olevilla soluilla, sekä hiirestä ja rotasta peräisin olevilla soluilla. CNF:n tutkimuksissa on esimerkiksi ihmisperäisinä soluina käytetty osteoblastien kaltaisia Saos-2 soluja, jotka on eristetty ihmisen osteosarkoomasta [7], sekä ihmisen luuytimen kantasoluja [34] ja ihmisen mesenkymaalisia kantasoluja (engl. hMSC, human mesenchymal stem cells) [6]. Hiirestä peräisin olevina soluina on CNF:n tutkimuksissa käytetty esimerkiksi osteoblastista MC3T3-E1 solulinjaa [8,32], mesenkymaalisia kantasoluja (D1-MSC) [38] tai fibroblastin kaltaisia NIH/3T3- [8] ja L929-soluja [36]. Rotan mesenkymaalisia stroomasoluja on myös käytetty CNF:n tutkimiseen [9].

Tutkittaessa CNF:ää on sitä usein jatkokäsitelty ja siihen on liitetty joitakin muita aineita, esimerkiksi hydroksiapatiittia [7,38], kalsiumfosfaattia [6], fosfaattia [8] tai muutettu CNF:n funktionaalisia ryhmiä [9], kuten aiemmin luvussa 3.2 eriteltiin. Sekä ihmisten soluilla, että hiiren ja rotan soluilla tehdyissä kokeissa on voitu todeta yhteneviä tuloksia. Solut kiinnittyivät ja jakaantuivat hyvin CNF:stä tehdyssä tukirungossa eikä sytotoksisuutta havaittu [6–9,32,34,36,38]. Tutkittaessa CNF:ää rotan mesenkymaalisilla stroomasoluilla analysoitiin solujen jakaantumista ja elinvoimaisuutta, ja verrattiin tätä BNC:hen ja kontrolliin eli muoviseen soluviljelyalustaan. CNF:n kanssa solujen jakaantuminen ja morfologia oli verrattavissa kontrolliin, mutta BNC:n kanssa solujen morfologia ja pinta-ala oli heikompi.[9] Hydroksiapatiitin läsnäolo ja mineralisoituminen edistivät solujen elinvoimaisuutta [7,32,38].

CNC:stä on tehty solutason tutkimuksia ihmisen ja hiirten soluilla. CNC:tä tukimateriaalina on tutkittu esimerkiksi hMSC-soluilla [20,37], ihmisen MG63-osteosarkoomasoluilla [21], ja ihmisen sikiön osteoblastisoluilla (engl. hFOB, human Fetal Osteoblasts) [1,12]. CNC:tä on CNF:n tavoin tutkittu myös MC3T3-E1 soluilla [19].

Kuten CNF:ää, myös CNC:tä on tutkittu soluilla lähinnä yhdistettynä muihin yhdisteisiin, kuten hydroksiapatiittiin [12,19], simuloituun kehonnesteeseen (engl. SBF, simulated body fluid) [1, 21], natriumalginaattiin [1], PLA:han [20] tai PVA:han [19]. CNC:n tutkimuksissa saatiin yhteneviä tuloksia, jotka osoittivat solujen kiinnittyvän tukirunkoon, sekä niiden jakaantumisen ja elinvoimaisuuden pysyvän normaaleina, joten merkittävää sytotoksisuutta ei havaittu [1,12,19–21,37]. Kuten CNF:n tutkimuksissa [7,32,38], myös CNC:n tutkimuksessa havaittiin hydroksiapatiitin lisäämisen CNC:hen lisäävän solujen elinvoimaisuutta verrattuna pelkkään CNC:hen [12].

BNC:tä on tutkittu enimmäkseen hiirten tai rotan soluilla. Monissa BNC:n tutkimuksissa on käytetty rotan luusta eristettyjä mesenkymaalaisia kantasoluja [24,30] tai muita osteogeenisiä soluja [23]. Myös hiiren NIH/3T3- [27], L929- [26], ja MC3T3-E1-soluilla [11] on tutkittu BNC:tä ja yhdessä tutkimuksessa on käytetty ihmisten luuytimen mesenkymaalaisia kantasoluja [25].

BNC:n tutkimuksissa on havaittu samankaltaisuutta CNF:n ja CNC:n tuloksiin. BNC ylläpiti hyvin solujen elinvoimaisuutta, solut jakaantuivat eikä sytotoksisuutta havaittu [11,23–27,30]. Soluilla esiintyi morfologisesti hyviä piirteitä, kuten solu-ulokkeita (engl. filopodia). BNC:n on havaittu stimuloivan mesenkymaalisten kantasolujen kollageeni I-verkoston muodostusta. Mesenkymaalisten kantasolujen havaittiin reagoivan BNC:hen erittäin hyvin, sillä solut kiinnittyivät ja levisivät nopeasti koko alueelle.[24]

Tutkimustulosten voidaan todeta olevan yhteneväisiä liittyen solujen elinvoimaisuuteen, kiinnittymiseen ja jakaantumiseen nanoselluloosatukirungossa riippumatta siitä, millaisessa käyttömuodossa nanoselluloosa solujen kasvualustana on ollut. Soluilla tehdyt tutkimukset on useimmiten tehty pakastekuivatetulla nanoselluloosahydrogeelillä [1,6,7,33] tai hydrogeelillä [9,31,32]. Myös esimerkiksi 3D-tulostettuja hydrogeelejä on käytetty solututkimuksiin [11,36–38], ja silti tulokset pysyvät yhtäläisinä. Yleisesti voidaan todeta, että nanoselluloosa edistää solujen elinvoimaisuutta ja jakaantumista. Tutkimustulokset toisaalta osoittavat myös

sen, että nanoselluloosan kyky edistää solujen kiinnittymistä materiaaliin, niiden elinvoimaisuutta, ja jakaantumista paranee merkittävästi, kun nanoselluloosaa yhdistetään muihin aineisiin.

4.2 Solujen erilaistuminen

Alkalinen fosfataasi (engl. ALP, alkaline phosphatase) on yksi varhaisen vaiheen luun muodostumisen eli osteogeneesin merkkiaineista, ja sen avulla tutkimuksissa on voitu määrittää solujen erilaistumista [7–9,19–21,23,25,30,32]. Toinen tapa mitata solujen erilaistumista osteoblasteiksi on transkriptiotekijä Runx2 (engl. Runt-related transcription factor 2) [7,20,30,34]. Muita merkkiaineita solujen erilaistumisen ja toiminnan mittaamiseen ovat esimerkiksi osteopontiini (OP) [7,25,30], osteokalsiini (OCN) [7,20,25,30], ja tyypin I kollageeni (COL-I) [7,20,34], joita osteoblastit ilmentävät. Osteoblastien toimintaa eli kykyä muodostaa luunkaltaista soluväliainetta voidaan analysoida myös mineralisaatiosta kertovalla Alizarin Red S-värjäyksellä (engl. ARS, Alizarin Red S-staining) [6,8,20,21].

Runx2 on tärkeä merkki solujen varhaisen vaiheen erilaistumisesta. Runx2 aktivoi muita tärkeitä erilaistumisen merkkiaineiden ilmentymistä, kuten yllä mainitut ALP, OP, OCN ja COL-I. Varhaisen vaiheen jälkeen solut alkavat tuottaa kollageenia, ja muodostaa ECM:a. Tässä vaiheessa ALP- ja COL-I-geenien ilmentyminen kasvaa. Lopuksi ECM mineralisoituu, jolloin erityisesti OCN:n ilmentyminen kasvaa.[7]

Kaikkien nanoselluloosamuotojen (CNF, CNC, BNC) on osoitettu lisäävän ALP:n ilmentymistä, mikä osoittaa, että solut erilaistuvat. [8,9,19–21,23,25,11,30,7,38,32,34,37] Nanoselluloosalla tukirunkomateriaalina onkin osteoinduktiivisia ominaisuuksia. Kuten solujen jakaantumisen havaittiin, myös erilaistumiseen vaikuttaa se, onko nanoselluloosa tukirunkona yksinään, vai onko siihen yhdistetty muita yhdisteitä. Hydroksiapatiitin [7], fosfaattiryhmien [8], ja kalsiumfosfaatin on havaittu lisäävän ALP:n ilmenemistä [25]. Hydroksiapatiitti lisäsi myös muiden erilaistumistekijöiden, kuten Runx2:n, COL-I:n, OP:n ja OCN:n ilmenemistä CNF:n ollessa tukirunkona [7]. Lisäämällä hydroksiapatiitin lisäksi kollageenia BNC:hen, huomattiin ALP:n ilmentymisen kasvavan verrattuna pelkkään BNC:hen, johon on lisätty hydroksiapatiittia [23]. Toisaalta, kun CNC:tä on lisätty polymeerien joukkoon, kuten PLA:han [20] tai PVA:han [19,21], kasvoi ALP:n ilmentyminen verrattuna pelkkään polymeeritukirunkoon.

ARS-värjäystä käyttäen on havaittu nanoselluloosan tukevan mineralisaatiota ja kalsiumker-
tymien muodostusta [6,8,9,21]. Mineralisaation edistämiseen CNF:n pinnalla on tutkimuksis-
sa käytetty hydroksiapatiittia [7], kalsiumfosfaattia [6], fosfaattia [8] tai SBF:ää [6]. Minerali-
saatiota edistävien yhdisteiden lisäyksen on havaittu parantavan solujen kiinnittymistä tuki-
runkoon, morfologiaa, elinvoimaisuutta ja jakaantumista [7,32]. ARS:n perusteella on huo-
mattu myös pelkän CNF:n ilman lisättyjä yhdisteitä edistävän paremmin mineralisaatiota ver-
rattuna kontrolliin eli muoviseen viljelyalustaan [9].

Soluilla tehdyt tutkimukset erilaistumisesta osoittavat yhteneviä tuloksia. Myös erilaistumi-
sessa, kuten jakaantumissessakin, nanoselluloosa lisää ALP:n ilmenemistä, ja siten edistää
kantasoluja erilaistumaan osteoblasteiksi riippumatta siitä, millainen solujen kasvualusta
nanoselluloosan tyyppin tai käyttömuodon suhteen oli kyseessä.

In vivo -kokeissa rottien ja hiirten kallonon tehtiin luupuutos poraamalla kallonluuhun reikä,
johon istutettiin nanoselluloosasta tehty implantti [20,29]. Luun uudismuodostusta implantissa
verrattiin kontrolliin, jossa implanttia ei käytetty ollenkaan [20] tai implanttiin, joka ei sisältä-
nyt nanoselluloosaa [29]. Kummassakin tutkimuksessa havaittiin nanoselluloosaimplantin
istutuksen saaneella jyräjällä enemmän luun uudismuodostusta verrattuna kontrolliin [20,29].
Huomattiin myös, että uuden luukudoksen muodostuminen alkoi implantin pinnalta, mutta
eteni myös sisempiin huokosiin osiin implanttia [29]. Tuloksista voidaan päätellä, että
nanoselluloosa implanttimateriaalina integroitui hyvin uudismuodostuneen luun kanssa, te-
hosti solujen erilaistumista, ja siten uuden luun muodostusta eli osoitti osteoinduktiivisia omi-
naisuuksia.

4.3 Immunologiset vasteet

Elimistön immunologista vastetta nanoselluloosaan on tutkittu rotilla [13,16,20,39] ja hiirillä
[29] in vivo -tutkimuksilla. Tähän on käytetty sekä ihonalaismalleja [13,16,39] että kallon
luun uudismuodostuksen malleja [20,29]. Ihonalaismalleissa CNF:n on havaittu aiheuttavan
kroonista tulehdusta. Lisäksi on havaittu lievää hylkimisreaktiota ja siihen liittyvien sytokii-
nien ilmenemistä, sekä sidekudoskapselin muodostusta. Nämä immunologiset vasteet syntyi-
vät viiveellä, ja ensimmäisten päivien ja viikkojen aikana ei havaittu merkittävää tulehdusta
tai sytokiinin tuoton kasvua.[13,16] Vertailtaessa CNC:tä, CNF:ää ja TEMPO-hapetettua

CNF:ää havaittiin, että TEMPO-hapetettu CNF ei kuitenkaan aiheuttanut tulehdus- tai hylkimisreaktiota edes pidemmällä aikavälillä (12 viikkoa) viiveestä huolimatta. Lisäksi vertailtaessa CNC:tä ja CNF:ää huomattiin, että CNC:n implantissa sidekudoksen muodostuminen materiaalin rajapintaan oli vähäisempää verrattuna CNF:ään.[13] TEMPO-hapetetun CNF:n lisäksi myöskään BNC:n ihonalaismallissa ei ole havaittu histologisesti merkkejä tulehdusreaktiosta tai hylkimisreaktiosta [39].

Toisin kuin ihonalaismalleissa, nanoselluloosaimplanteja ja kallon luun uudismuodostusta tutkittaessa ei ole havaittavissa samanlaisia immunologisia vasteita [20,29]. Rotilla tehdyssä kallon luun mallissa CNC:tä tutkittiin PLA-CNC-komposiittina. PLA-CNC:n ei histologisesti havaittu aiheuttavan tulehdusreaktiota implantin läheisyydessä.[20], eikä CNF:stä koostuvan implantin läheisyydessä myöskään ei havaittu vastaavaa tulehdusreaktiota [29].

Ristiriitaisuudet nanoselluloosan aiheuttamassa tulehdus- ja hylkimisreaktiossa voivat johtua nanoselluloosan eri muotojen eriävistä ominaisuuksista, ja siitä, miten nanoselluloosaa on jatkokäsitelty. Nanoselluloosan pinnan kemiallinen koostumus voi olla selittävä tekijä, miksi joissakin malleissa syntyy tulehdusta ja hylkimisreaktiota, mutta toisissa tutkimusasetelmissä ei havaita merkittävää vastetta [13,16].

On saatu tutkimustuloksia siitä, miten implanttimateriaalin huokosten koko ja kuitujen pituus vaikuttavat hylkimisreaktion syntyyn, ja makrofagien polarisoitumiseen joko tulehdusta edistäviksi M1- tai tulehdusta hillitseviksi M2-makrofageiksi. On havaittu, että materiaalin suurempi huokosen koko ja kuitujen pituus μm :n mittakaavassa johtaa makrofagien aktivoitumiseen M2-makrofageiksi, ja vähäisempään hylkimisreaktioon. M2-makrofagit osallistuvat tulehduksen hillitsemisen lisäksi kudoksen korjaukseen ja paranemiseen. [40,41] Materiaalin aiheuttaman tulehdus- ja hylkimisreaktion minimoimiseksi olisi siis edullista, että makrofageja polarisoituisi enemmän M2-makrofageiksi niiden tulehdusta hillitsevien vaikutusten vuoksi. Toisaalta molempia makrofagityyppejä tarvitaan kudoksen uudismuodostuksessa, sillä myös tulehdusta edistäviksi polarisoituneet M1-makrofagit osallistuvat kudoksen uudelleen järjestäytymiseen vaurioituneella alueella [40,41]. Materiaalin huokosten ja kuitujen kokoa saattaisikin olla hyödyllistä optimoida immunologisen vasteen pienentämiseksi.

4.4 Nanoselluloosan hajoaminen

Nanoselluloosa hajoaa elimistössä oletettavasti hitaasti, sillä ihmisillä ei ole sellulaasi-entsyymejä, jotka hajottaisivat nanoselluloosaa [3,4]. On kuitenkin tutkimustuloksia siitä, että makrofagit fagosytoivat jonkin verran nanoselluloosaa, ja siten jonkin verran nanoselluloosaa hajoaisi elimistössä [17]. Lisäksi on tehty tutkimuksia nanoselluloosan hydrolyyttisestä hajoamisesta fosfaattipuskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa (PBS) [1,3,42] ja SBF:ssä [1,14]. Yhteneviä tuloksia on saatu siitä, että hajoaminen vähenee nanoselluloosan konsentraation kasvaessa. Hajoamista mitattiin tutkimuksissa materiaalin painon vähenemisenä (5 pv, 7 pv tai 14 pv), ja paino väheni 40-94% välillä riippuen nanoselluloosan konsentraatiosta.[1,3,14,42] Näin ollen voidaan todeta, että nanoselluloosa hajoaa jonkin verran hydrolyyttisesti, sekä elimistön fagosytoivien solujen toimesta. Luukudokseen liittyvissä in vivo -tutkimuksissa havaittiin, että käytettäessä nanoselluloosaa implanttimateriaalina tapahtui uudismuodostuneessa luukudoksessa jonkin verran implantin resorboitumista [29]. Tuloksesta voidaan päätellä, että pidemmän ajan kuluessa on mahdollisuus siihen, että nanoselluloosaimplanti voisi hajota pois uuden luukudoksen tieltä.

Nanoselluloosan käsittely perjodaattihapetuksella (engl. periodate oxidation) saa aikaan nanoselluloosan hajoamisen 2,3-dialdehydi selluloosaksi (DAC). Yhden tutkimuksen mukaan DAC säilyttää nanoselluloosan kolmiulotteisen rakenteen, ja siten soveltuisi samoihin kudos-tekniologiin käyttötarkoituksiin.[43] Verrattuna nanoselluloosaan 2,3-dialdehydi selluloosalle on kuitenkin ominaista sen kyky hajota fysiologisessa pH:ssa. DAC hajoaa glykolihapoksi, joka erittyy virtsan mukana, ja 2,4-dihydroksibutaanin hapoksi, joka on välituotteena maksan L-homoseriinin aineenvaihdunnassa.[4,43] DAC tarjoaakin hyvän mahdollisuuden itsestään häviävälle luun implanttimateriaalille verrattuna nanoselluloosaan, joka hajoaa oletettavasti hitaasti. Toisaalta ei ole varmuutta siitä, hajoaisiko DAC liiankin nopeasti elimistössä, jolloin luu ei välttämättä ehtisi parantua kunnolla ennen kuin implanttimateriaali on jo ehtinyt hajota. Nanoselluloosa sellaisenaan ilman käsittelyä olisi siten vakaampi vaihtoehto luun implanttimateriaaliksi.

4.5 Nanoselluloosan haittavaikutukset

Aiemmin luvussa 4.1 todettiin, että nanoselluloosa edistää luusolujen elinvoimaisuutta. Nanoselluloosa ei ole osoittanut sytotoksisuutta luusoluille niin lukuisissa vanhemmissa kuin

tuoreemmissakaan tutkimuksissa [6–9,11,12,19–21,23–25,27,30,32,34,36–38,44]. CNF:ää ja CNC:tä on tutkittu vuonna 2016 julkaistussa tutkimuksessa seeprakalojen alkioilla, jossa nanoselluloosan osoitettiin olevan turvallinen eikä aiheuttavan toksisuutta kehittyville seeprakaloille [45]. Uusille kattavammille tutkimuksille olisi kuitenkin tarvetta etenkin nanoselluloosan turvallisuudesta luun kudosteknologisena materiaalina.

Nanoselluloosan toksisia vaikutuksia hengitystie-elimistöön ja sen soluihin on tutkittu tähän mennessä eniten. Tämä luultavimmin johtuu nanoselluloosan kuitumaisesta rakenteesta, ja muiden kuitumateriaalien tiedetyistä haitoista hengityselimistölle. Ihmisen keuhkon adenokarsinoman epiteelisoluilla [18] ja ihmisen keuhkoputken epiteelisoluilla [46] tehdyillä tutkimuksilla ei havaittu nanoselluloosan aiheuttavan genotoksisuutta.

Hiirillä tehdyissä tutkimuksissa nanoselluloosa ei aiheuttanut systeemisiä genotoksisia vaikutuksia, mutta paikallisesti havaittiin DNA-vaurioita ja tulehdusreaktiota [17,47]. Myös rotilla tehdyssä suun kautta altistettavassa yhden annoksen akuutin toksisuuden kokeessa havaittiin nanoselluloosan olevan turvallinen annosmäärällä 2000 mg/kg [47]. Vaikka yksittäiset tutkimukset näyttävät nanoselluloosan olevan suhteellisen turvallinen, on silti tarvetta tuoreemmalle tutkimustiedolle etenkin luun kudosteknologian näkökulmasta. Lisäksi pidemmille toksisuuskokeille on tarvetta, jotta pidempiaikaisten altistusten mahdolliset haitat saadaan selvitettyä.

5 Tulevaisuuden näkymät

In vivo -kokeissa on saatu lupaavia tuloksia nanoselluloosasta luun implanttimateriaalina. Nanoselluloosan on kokeissa havaittu nopeuttavan luun uudismuodostusta verrattuna kontrolliin, jossa ei käytetty implanttia tai jossa implantti oli muuta materiaalia kuin nanoselluloosaa.[20,29] Nanoselluloosan turvallisuuteen tulisi kuitenkin kiinnittää huomiota, ja mahdollisista haittavaikutuksista vaadittaisiin kattavampia tutkimustuloksia ennen klinisiin kokeisiin siirtymistä. Kliinisiä kokeita nanoselluloosasta luun kudosteknologiassa ei vielä ole tehty, mutta esimerkiksi UPM:llä on myynnissä kliiniseen käyttöön nanoselluloosaa sidemateriaaliksi haavanhoitoon [48–50].

Uutta tutkimusta nanoselluloosasta voitaisiin kohdentaa nanoselluloosan muokkaukseen edullisemmaksi luun kudosteknologiselta kannalta. Esimerkiksi luun implanttimateriaalin käyttötarkoituksessa hydroksiapatiitista ja nanoselluloosan mineralisaatiosta on lupaavia tutkimustuloksia. Aiemmin luvussa 4 tultiin siihen tulokseen, että hydroksiapatiitti ja muut mineralisaatiota edistävät aineet yhdistettynä nanoselluloosaan saivat aikaan paremman vasteen solujen jakautumisessa ja erilaistumisessa [7,12,32,38]. Olisikin hyödyllistä lisätä aineita jäljittelemään solujen luonnollista ympäristöä luun uudismuodostuksen edistämiseksi. Toinen mahdollinen uusi näkökulma materiaalin optimoimisesta luun uudismuodostusta edistäväksi on bioaktiivisten aineiden lisäys nanoselluloosaan joko kasvutekijöiden tai lääkeaineiden muodossa. Vaihtoehtoja näille materiaalin lisäaineille on paljon, joten niiden tehokkuutta vertaileville tutkimuksille on tarvetta.

Kliinisten kokeiden lisäksi markkinoille tuontiin voi liittyä useita haasteita, etenkin nyky menetelmien soveltamisesta massatuotantoon. Toisaalta CNF:n ja CNC:n raaka-aineet ovat halpoja ja helposti saatavilla, mikä tekisi niiden massatuotannosta kustannustehokasta. Nanoselluloosan tuotantoprosessin aikana saattaa ilmaan levitä hiukkasia, jotka voivat päätyä hengityselimistöön. Nanoselluloosan rakenteen vuoksi hiukkasten koko voi olla niin pieni, että ne voivat päästä syvälle keuhkoihin. Lisäksi tiedetään esimerkiksi puupölyn sekä joidenkin kuitumateriaalien voivan aiheuttaa terveyshaittoja hengityselimistölle, joten mahdollista altistumista nanoselluloosalle eri tavoin tulisi tutkia enemmän, vaikka käyttökohde olisikin luukudos. Tarvitaankin lisää tutkimuksia nanoselluloosan toksisuudesta pitkällä aikavälillä, sillä tällä hetkellä aiheesta ei ole olemassa kovinkaan kattavia tutkimustuloksia.

6 Johtopäätökset

Tämän tutkielman tarkoituksena oli luoda yleiskuvaa nanoselluloosan mahdollisuuksista luun kudosteknologiassa. Tutkielmassa tarkasteltiin nanoselluloosan rakennetta, sen eri muotoja ja tuotantomenetelmiä. Nanoselluloosan kolme tärkeintä muotoa ovat CNF, CNC ja BNC. Lisäksi käsiteltiin nanoselluloosan jatkosovelluksia eri käyttömuotoihin, joista yleisimpiä ovat hydrogeelit, ja käytiin läpi yleisimpiä lisäaineita, kuten hydroksiapatiitti, joilla nanoselluloosan ominaisuuksia tehostetaan.

Tutkielmassa selvitettiin nanoselluloosan bioyhteensopivuutta luukudoksen kanssa ja sitä, miten nanoselluloosa vuorovaikuttaa luusolujen kanssa. Useat lähteet osoittavat yhteneviä ja ajankohtaisia tuloksia siitä, että nanoselluloosa on bioyhteensopiva luukudoksen kanssa. Nanoselluloosa on materiaalina sekä osteokonduktiivinen että osteoinduktiivinen. Selvitettiin myös mahdollista elimistön immunologisen vasteen muodostumista nanoselluloosalle, joista tutkimustulokset kuitenkin olivat vielä puutteellisia ja eniten ristiriidassa keskenään. Käsiteltiin myös muita mahdollisia aiheutuvia haittoja.

Tutkielmassa tehtiin katsaus nanoselluloosan tulevaisuuden kehityskohteille luun kudosteknologisena materiaalina. Lopuksi luvussa 5 ehdotettiin nanoselluloosan tulevaisuuden kehityskohteita, joita ovat kokonaisvaltaisen immunologisten ja toksikologisten vasteiden tutkimustiedon puutokset, sekä kliinisiin kokeisiin ja markkinoiden massatuotantoon siirtyminen.

Nanoselluloosan mahdollisuudet luun kudosteknologisena materiaalina ovat lupaavia, kuten tämän tutkielman katsaus osoittaa. Nanoselluloosa on tämänhetkisen tutkimukseen perustuvan tiedon pohjalta hyvä uusi kehitettävä materiaali nykyisten luun vaurioiden hoitomenetelmien rinnalle, sillä nanoselluloosa sekä mahdollistaa luukudoksen uudismuodostusta että edistää sitä. Nanoselluloosan kliininen käyttö haavanhoidossa sidemateriaalina osoittaa nanoselluloosan käyttömahdollisuudet myös muun kudosteknologian osa-alueilla, ja myös sen mahdollisuudet muihin sovelluksiin lääketieteessä.

Lähteet

1. Bakhiet E, Mohamat Johari NFI, Jahir Hussain FS, Zulkifli FH (2023) Biomineralization of carboxymethyl cellulose-sodium alginate infused with cellulose nanocrystals for bone regeneration. *J Bioact Compat Polym* 38:400–414
2. Odén A, McCloskey EV, Kanis JA, Harvey NC, Johansson H (2015) Burden of high fracture probability worldwide: secular increases 2010–2040. *Osteoporos Int* 26:2243–2248
3. Iswarya S, Theivasanthi T, Gopinath SCB (2023) Sodium alginate/Hydroxyapatite/nanocellulose composites: Synthesis and Potentials for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* 148:106189
4. Yang G, Ullah MW, Shi Z (2021) Nanocellulose: Synthesis, Structure, Properties and Applications. *Sivut: 2,3,5,9-11,14,17-19,29*
5. Hanieh Kargarzadeh IA Sabu Thomas, Alain Dufresne / Hanieh Kargarzadeh, Ishak Ahmad, Sabu Thomas, Alain Dufresne (2017) *Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites*, 1st ed. *Sivut: 3-6,11,12,18,19*
6. Salama A, Abou-Zeid RE, Cruz-Maya I, Guarino V (2020) Soy protein hydrolysate grafted cellulose nanofibrils with bioactive signals for bone repair and regeneration. *Carbohydr Polym* 229:115472
7. Korkeamäki JT, Rashad A, Berstad K, Weber F, Syverud K, Haugen HJ, Mustafa K (2024) Biomimetic highly porous nanocellulose–nanohydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Cellulose* 31:2503–2521
8. Liu Q, Li Q, Hatakeyama M, Kitaoka T (2023) Proliferation and differential regulation of osteoblasts cultured on surface-phosphorylated cellulose nanofiber scaffolds. *Int J Biol Macromol* 253:126842
9. Rashad A, Grøndahl M, Heggset EB, Mustafa K, Syverud K (2023) Responses of Rat Mesenchymal Stromal Cells to Nanocellulose with Different Functional Groups. *ACS Appl Bio Mater* 6:987–998
10. Saelee K, Yingkamhaeng N, Nimchua T, Sukyai P (2016) An environmentally friendly xylanase-assisted pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from sugarcane bagasse by high-pressure homogenization. *Ind Crops Prod* 82:149–160
11. Wang X, Tang S, Chai S, Wang P, Qin J, Pei W, Bian H, Jiang Q, Huang C (2021) Preparing printable bacterial cellulose based gelatin gel to promote in vivo bone regeneration. *Carbohydr Polym* 270:118342
12. Ingole VH, Vuherer T, Maver U, Vinchurkar A, Ghule AV, Kokol V (2019) Mechanical Properties and Cytotoxicity of Differently Structured Nanocellulose-hydroxyapatite Based Composites for Bone Regeneration Application. *Nanomaterials* 10:25
13. Ho HV, Makkar P, Padalhin AR, Le TTT, Lee SY, Jaegyong G, Lee B-T (2020) Preliminary studies on the in vivo performance of various kinds of nanocellulose for biomedical applications. *J Biomater Appl* 34:942–951
14. Sultana T, Van Hai H, Abueva C, Kang HJ, Lee S-Y, Lee B-T (2019) TEMPO oxidized nanocellulose containing thermo-responsive injectable hydrogel for post-surgical peritoneal tissue adhesion prevention. *Mater Sci Eng C* 102:12–21

15. Cañas-Gutiérrez A, Martínez-Correa E, Suárez-Avendaño D, Arboleda-Toro D, Castro-Herazo C (2020) Influence of bacterial nanocellulose surface modification on calcium phosphates precipitation for bone tissue engineering. *Cellulose* 27:10747–10763
16. Rashad A, Suliman S, Mustafa M, Pedersen TØ, Campodoni E, Sandri M, Syverud K, Mustafa K (2019) Inflammatory responses and tissue reactions to wood-Based nanocellulose scaffolds. *Mater Sci Eng C* 97:208–221
17. Catalán J, Rydman E, Aimonen K, ym. (2017) Genotoxic and inflammatory effects of nanofibrillated cellulose in murine lungs. *Mutagenesis* 32:23–31
18. Pinto F, Lourenço AF, Pedrosa JFS, ym. (2022) Analysis of the In Vitro Toxicity of Nanocelluloses in Human Lung Cells as Compared to Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanomaterials* 12:1432
19. Tien Lam N, Minh Quan V, Boonrungsiman S, Sukyai P (2022) Effectiveness of bio-dispersant in homogenizing hydroxyapatite for proliferation and differentiation of osteoblast. *J Colloid Interface Sci* 611:491–502
20. Patel DK, Dutta SD, Hexiu J, Ganguly K, Lim K-T (2020) Bioactive electrospun nanocomposite scaffolds of poly(lactic acid)/cellulose nanocrystals for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 162:1429–1441
21. Ali A, Bano S, Poojary S, Chaudhary A, Kumar D, Negi YS (2022) Effect of cellulose nanocrystals on chitosan/PVA/nano β -TCP composite scaffold for bone tissue engineering application. *J Biomater Sci Polym Ed* 33:1–19
22. Miguel Gama PG Dieter Klemm / Miguel Gama, Paul Gatenholm, Dieter Klemm (2012) *Bacterial NanoCellulose: A Sophisticated Multifunctional Material (Edition 1)*, 1st edition. Sivut: 3-5,23
23. Saska S, Teixeira LN, De Castro Raucci LMS, ym. (2017) Nanocellulose-collagen-apatite composite associated with osteogenic growth peptide for bone regeneration. *Int J Biol Macromol* 103:467–476
24. Vielreicher M, Kralisch D, Völkl S, Sternal F, Arkudas A, Friedrich O (2018) Bacterial nanocellulose stimulates mesenchymal stem cell expansion and formation of stable collagen-I networks as a novel biomaterial in tissue engineering. *Sci Rep* 8:9401
25. Cañas-Gutiérrez A, Toro L, Fornaguera C, Borrós S, Osorio M, Castro-Herazo C, Arboleda-Toro D (2023) Biomineralization in Three-Dimensional Scaffolds Based on Bacterial Nanocellulose for Bone Tissue Engineering: Feature Characterization and Stem Cell Differentiation. *Polymers* 15:2012
26. Gaulke E, Garcia MCF, Segat B, Apati GP, Schneider ALDS, Pezzin APT, Cesca K, Porto LM (2023) Evaluation of potential biomaterials for application in guide bone regeneration from Bacterial Nanocellulose/Hydroxyapatite. *Polímeros* 33:e20230034
27. Osorio M, Fernández-Morales P, Gañán P, Zuluaga R, Kerguelen H, Ortiz I, Castro C (2019) Development of novel three-dimensional scaffolds based on bacterial nanocellulose for tissue engineering and regenerative medicine: Effect of processing methods, pore size, and surface area. *J Biomed Mater Res A* 107:348–359
28. Niamsap T, Lam NT, Sukyai P (2019) Production of hydroxyapatite-bacterial nanocellulose scaffold with assist of cellulose nanocrystals. *Carbohydr Polym* 205:159–166

29. Sukul M, Nguyen TBL, Min Y-K, Lee S-Y, Lee B-T (2015) Effect of Local Sustainable Release of BMP2-VEGF from Nano-Cellulose Loaded in Sponge Biphasic Calcium Phosphate on Bone Regeneration. *Tissue Eng Part A* 21:1822–1836
30. Liu F, Wei B, Xu X, ym. (2021) Nanocellulose-Reinforced Hydroxyapatite Nanobelt Membrane as a Stem Cell Multi-Lineage Differentiation Platform for Biomimetic Construction of Bioactive 3D Osteoid Tissue In Vitro. *Adv Healthc Mater* 10:2001851
31. Nishiguchi A, Taguchi T (2019) Osteoclast-Responsive, Injectable Bone of Bisphosphonated-Nanocellulose that Regulates Osteoclast/Osteoblast Activity for Bone Regeneration. *Biomacromolecules* 20:1385–1393
32. Cui S, Zhang S, Coseri S (2023) An injectable and self-healing cellulose nanofiber-reinforced alginate hydrogel for bone repair. *Carbohydr Polym* 300:120243
33. Maestri CA, Motta A, Moschini L, Bernkop-Schnürch A, Baus RA, Lecca P, Scarpa M (2020) Composite nanocellulose-based hydrogels with spatially oriented degradation and retarded release of macromolecules. *J Biomed Mater Res A* 108:1509–1519
34. Carlström IE, Rashad A, Campodoni E, Sandri M, Syverud K, Bolstad AI, Mustafa K (2020) Cross-linked gelatin-nanocellulose scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Lett* 264:127326
35. Buchtová N, Pradille C, Bouvard J-L, Budtova T (2019) Mechanical properties of cellulose aerogels and cryogels. *Soft Matter* 15:7901–7908
36. Cernencu AI, Vlasceanu GM, Serafim A, Pircalabioru G, Ionita M (2023) 3D double-reinforced graphene oxide – nanocellulose biomaterial inks for tissue engineered constructs. *RSC Adv* 13:24053–24063
37. Patel DK, Dutta SD, Shin W-C, Ganguly K, Lim K-T (2021) Fabrication and characterization of 3D printable nanocellulose-based hydrogels for tissue engineering. *RSC Adv* 11:7466–7478
38. Lafuente-Merchan M, Ruiz-Alonso S, García-Villén F, Zabala A, De Retana AMO, Gallego I, Saenz-del-Burgo L, Pedraz JL (2022) 3D Bioprinted Hydroxyapatite or Graphene Oxide Containing Nanocellulose-Based Scaffolds for Bone Regeneration. *Macromol Biosci* 22:2200236
39. Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B (2006) *In vivo* biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A* 76A:431–438
40. Sussman EM, Halpin MC, Muster J, Moon RT, Ratner BD (2014) Porous Implants Modulate Healing and Induce Shifts in Local Macrophage Polarization in the Foreign Body Reaction. *Ann Biomed Eng* 42:1508–1516
41. Garg K, Pullen NA, Oskeritzian CA, Ryan JJ, Bowlin GL (2013) Macrophage functional polarization (M1/M2) in response to varying fiber and pore dimensions of electrospun scaffolds. *Biomaterials* 34:4439–4451
42. P NC, S KB, V SK (2022) Multifunctional organic and inorganic hybrid bionanocomposite of chitosan/poly(vinyl alcohol)/nanobioactive glass/nanocellulose for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* 135:105427
43. Li J, Wan Y, Li L, Liang H, Wang J (2009) Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C* 29:1635–1642

44. Bakhiet E, Mohamat Johari NFI, Jahir Hussain FS, Zulkifli FH (2023) Biomineralization of carboxymethyl cellulose-sodium alginate infused with cellulose nanocrystals for bone regeneration. *J Bioact Compat Polym* 38:400–414
45. Harper BJ, Clendaniel A, Sinche F, Way D, Hughes M, Schardt J, Simonsen J, Stefaniak AB, Harper SL (2016) Impacts of chemical modification on the toxicity of diverse nanocellulose materials to developing zebrafish. *Cellulose* 23:1763–1775
46. Catalán J, Ilves M, Järventaus H, Hannukainen K, Kontturi E, Vanhala E, Alenius H, Savolainen KM, Norppa H (2015) Genotoxic and immunotoxic effects of cellulose nanocrystals in vitro. *Environ Mol Mutagen* 56:171–182
47. Pinto FCM, De-Oliveira ACAX, De-Carvalho RR, Gomes-Carneiro MR, Coelho DR, Lima SVC, Paumgartten FJR, Aguiar JLA (2016) Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and anti-genotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. *Carbohydr Polym* 137:556–560
48. UPM Biomedicals, Clinical Products, FibDex. <https://www.upmbiomedicals.com/products/clinical/fibdex/> Viitattu 8.4.2024.
49. Hakkarainen T, Koivuniemi R, Kosonen M, ym. (2016) Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment. *J Controlled Release* 244:292–301
50. Koivuniemi R, Hakkarainen T, Kiiskinen J, Kosonen M, Vuola J, Valtonen J, Luukko K, Kavola H, Yliperttula M (2020) Clinical Study of Nanofibrillar Cellulose Hydrogel Dressing for Skin Graft Donor Site Treatment. *Adv Wound Care* 9:199–210